

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 6 日
Date of Application:

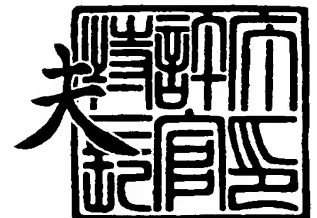
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 8 6 4 9 1
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 8 6 4 9 1]

出 願 人 シスメックス株式会社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 3 月 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1126A

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/569

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市本荘 1 丁目 1 番 1 号 熊本大学医学部付属
 病院内

 【氏名】 山口 一成

【発明者】

 【住所又は居所】 宮崎県宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 宮崎大学農学部付
 属家畜病院内

 【氏名】 堀井 洋一郎

【発明者】

 【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
 株式会社内

 【氏名】 高浜 洋一

【発明者】

 【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
 株式会社内

 【氏名】 永井 慎也

【特許出願人】

 【識別番号】 390014960

 【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

 【電話番号】 03-3864-6572

【選任した代理人】

【識別番号】 100124453

【弁理士】

【氏名又は名称】 資延 由利子

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 78898

【出願日】 平成15年 3月20日

【整理番号】 NP02-1126

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0200385

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ボルナ病ウイルス検出抗原及び試薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下に示すいずれかの抗原ポリペプチド；

- 1) ボルナ病ウイルス (BDV) 蛋白質の p10 領域から選択された抗原ポリペプチドであって、該ポリペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗 BDV 抗体検出能を有することを特徴とする抗原ポリペプチド。
- 2) 上記 1) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、少なくとも 8 個のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。
- 3) 上記 2) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、8～20 のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。
- 4) 配列番号 5、6、7 又は 8 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド。
- 5) 上記 1)～4) のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗 BDV 抗体検出能を有する抗原ポリペプチド。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の抗原ポリペプチドに、1 若しくは複数個のアミノ酸からなるスペーサを付加したポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の抗原ポリペプチドを蛋白質と結合して用いるコンジュゲート BDV 抗原。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれか 1 に記載の抗原ポリペプチド又はコンジュゲート BDV 抗原を使用する抗 BDV 抗体の検出方法。

【請求項 5】 請求項 1～3 のいずれか 1 に記載の抗原ポリペプチド及び／又はコンジュゲート BDV 抗原と、以下に示すいずれかのポリペプチド及び／又はコンジュゲート BDV 抗原を少なくとも 1 つ選択して組み合わせて使用する抗 BDV 抗体の検出方法；

- 1) 配列番号 1～6 のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む抗原ポリペプチド。

2) 上記 1) に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗 B D V 抗体検出能を有する抗原ポリペプチド。

3) 上記 1) 及び／又は 2) に記載の抗原ポリペプチドに、1 若しくは複数個のアミノ酸からなるスペーサを付加したポリペプチド。

4) 上記 1) ～ 3) のいずれか 1 に記載のポリペプチドを蛋白質と結合して用いるコンジュゲート B D V 抗原。

【請求項 6】 抗 B D V 抗体の検出方法が免疫凝集反応による請求項 4 又は 5 に記載の抗体検出方法。

【請求項 7】 免疫凝集反応が微粒子計数免疫測定法である請求項 6 に記載の抗体検出方法。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載のポリペプチド又は抗原を含む抗 B D V 抗体検出用試薬。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載のポリペプチド又は抗原が不溶性担体に感作されてなる請求項 8 に記載の試薬。

【請求項 10】 請求項 8 又は 9 に記載する抗 B D V 抗体検出用試薬を 1 若しくは複数個含む抗 B D V 抗体検出用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗 B D V 抗体測定用ポリペプチド及び抗 B D V 抗体測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ボルナ病ウイルス(Borna Disease Virus, 以下「B D V」という。)を原因ウイルスとする免疫関与神経症候群であるボルナ病についてはいまだ解明されていないことも多い。ボルナ病は、ドイツ及びその周辺諸国で、四季を通じて馬に発生するウイルス性脳脊髄縁である。脳性麻痺や情動傷害等の症状を呈し、急性経過

をたどると致死적である。脳性麻痺や情動傷害等の症状を呈し、急性経過をたどると致死적である。ラットに実験的に感染させると、多動、常同行動、運動障害及び失調症を特徴とする多相性症候群を発症する(0. Narayanら, Science, 220: 1401-1403(1983))。

【 0 0 0 3 】

B D V は、自然宿主であるウマに対する病原性が知られており、1985年に精神疾患患者の血清中に B D V と反応する抗体が存在することが指摘され、ヒトに対しても病原性をもつ可能性が示唆されてきた。B D V の感染疫学的研究は、精神疾患の理解に多大な貢献をすることになる。最近、B D V 遺伝子が精神疾患遺伝子群の血球にある頻度で認められている。

【 0 0 0 4 】

B D V は低い力価でしか増殖しないので、分析のために精製することは困難である。B D V 感染の診断は、この疾患に共通する臨床症状の出現、及び間接免疫蛍光検査 (I F T) (G . Pauli ら、Zbl. Vet. Med. [B] , 31:552-557 (1984))、ウエスタンブロット又は免疫沈澱等により、感染細胞中のウイルス蛋白質を検出する血清抗体を検出することにより行っている。これらの方法は取り扱いが難しく、ヒトや家畜集団の大量調査で用いるのは困難である。

B D V の配列は既に解明され、抗 B D V 抗体をエライザ法 (ELISA) で測定する方法が報告されており、ここでは p 2 3、r e c p 2 3、p 4 0 及び r e c p 4 0 抗原を使用している (特許文献 1)。また、血漿中の B D V 特異的な循環免疫複合体 (C I C) を決定する事を含む試験方法も報告されており、ここでは p 4 0 及び p 2 4 抗原が使用されている (特許文献 2)。さらに、p 4 0 及び p 2 4 の領域から選択される具体的なアミノ酸配列を含む抗原ポリペプチドを用いた磁気ビーズによる抗体検出方法も報告されている (特許文献 3)。

【 0 0 0 5 】

しかしながら、B D V の性質については、未だ十分に解明されているとはいえず、B D V に対する抗体の出現の時期や正確な抗体の検出方法については不明な点が多く残されており、より正確な抗体検出方法の開発が望まれている。

【 0 0 0 6 】

【特許文献 1】

特開 2 0 0 2 - 1 9 0 2 8 8 号公報

【特許文献 2】

特表 2 0 0 2 - 5 0 0 3 6 3 号公報

【特許文献 3】

特開平 1 1 - 1 8 0 9 9 8 号公報

【0 0 0 7】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、BDV に対する抗体検査をより正確に実施するための抗原ポリペプチド及び該ポリペプチドを用いた抗BDV抗体測定方法を提供することにある。

【0 0 0 8】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、BDVを構成する蛋白質のうち、p 1 0 領域から選択された抗原を単独あるいは p 2 4 領域及び／又は p 4 0 領域から選択される抗原ポリペプチドと組み合わせて使用することにより、上記課題を解決しうることを見出し、本発明を完成した。

【0 0 0 9】

すなわち本発明は、

1. 以下に示すいずれかの抗原ポリペプチド；

1) ボルナ病ウイルス (BDV) 蛋白質の p 1 0 領域から選択された抗原ポリペプチドであって、該ポリペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗BDV抗体検出能を有することを特徴とする抗原ポリペプチド。

2) 上記 1) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、少なくとも 8 個のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

3) 上記 2) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、8 ～ 2 0 のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

4) 配列番号 5、6、7 又は 8 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

5) 上記 1) ~ 4) のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗 B D V 抗体検出能を有する抗原ポリペプチド、

2. 前項 1 に記載の抗原ポリペプチドに、1 若しくは複数個のアミノ酸からなるスペーサを付加したポリペプチド、

3. 前項 1 又は 2 に記載の抗原ポリペプチドを蛋白質と結合して用いるコンジュゲート B D V 抗原、

4. 前項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の抗原ポリペプチド又はコンジュゲート B D V 抗原を使用する抗 B D V 抗体の検出方法、

5. 前項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の抗原ポリペプチド及び／又はコンジュゲート B D V 抗原と、以下に示すいずれかのポリペプチド及び／又はコンジュゲート B D V 抗原を少なくとも 1 つ選択して組み合わせて使用する抗 B D V 抗体の検出方法；

1) 配列番号 1 ~ 6 のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む抗原ポリペプチド。

2) 上記 1) に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗 B D V 抗体検出能を有する抗原ポリペプチド。

3) 上記 1) 及び／又は 2) に記載の抗原ポリペプチドに、1 若しくは複数個のアミノ酸からなるスペーサを付加したポリペプチド。

4) 上記 1) ~ 3) のいずれか 1 に記載のポリペプチドを蛋白質と結合して用いるコンジュゲート B D V 抗原、

6. 抗 B D V 抗体の検出方法が免疫凝集反応による前項 4 又は 5 に記載の抗体検出方法、

7. 免疫凝集反応が微粒子計数免疫測定法である前項 6 に記載の抗体検出方法、

8. 前項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載のポリペプチド又は抗原を含む抗 B D V 抗体検出用試薬、

9. 前項 1～3 のいずれか 1 に記載のポリペプチド又は抗原が不溶性担体に感作されてなる前項 8 に記載の試薬、

10. 前項 8 又は 9 に記載する抗 BDV 抗体検出用試薬を 1 若しくは複数個含む抗 BDV 抗体検出用試薬キット、からなる。

【0010】

【発明の実施の形態】

(抗原ポリペプチド)

BDV の感染の診断を行うために、本発明の抗原ポリペプチド、すなわち以下に示すいずれかの抗原ポリペプチドを用いることができる。具体的には、次の 1)～4) のいずれかに記載の抗原ポリペプチドを使用することができる。

1) BDV 蛋白質の p10 領域から選択された抗原ポリペプチドであって、該ポリペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗 BDV 抗体検出能を有することを特徴とする抗原ポリペプチド。

2) 上記 1) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、少なくとも 8 個のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

2) 上記 1) に記載の選択された抗原ポリペプチドが、8～20 のアミノ酸から構成されることを特徴とする抗原ポリペプチド。

3) 配列番号 5、6、7 又は 8 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

4) 上記 1)～3) のいずれか 1 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗 BDV 抗体検出能を有する抗原ポリペプチド。

【0011】

上記の抗原ポリペプチドは、1 若しくは複数種選択することができる。また、他の公知の抗原及び／又は抗原ポリペプチドと組み合わせて使用することができる。例えば、BDV 蛋白質の p24 領域及び／又は p40 領域から選択される抗原ポリペプチドを組み合わせて使用することができる。具体的には、1) 配列番号 1～6 のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む抗原ポリペプチド、

2) 上記 1) に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、

置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、該ペプチド単独で、若しくは他の抗原ペプチドと組み合わせて用いることにより抗BDV抗体検出能を有する抗原ポリペプチドと組み合わせて使用することができる。また、一のポリペプチドに、少なくとも配列番号5、6、7、8に記載のアミノ酸配列を1又は2以上含有したポリペプチドを用いて、BDV抗体を検出しても良い。また、この配列番号5、6、7、8に示されるポリペプチドは、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであっても良い。

【0012】

本発明で使用する抗原ポリペプチドは、配列情報に基づいて、通常の手法で合成により調製することができる。また、抗原ポリペプチドを固相担体や、蛋白質等に効率良く結合させる目的で、1若しくは複数個のアミノ酸をスペーサとして抗原ポリペプチドのN末端側に付加することができる。スペーサとして機能するアミノ酸の例としては、グリシン、リジンが挙げられるが、好ましくはグリシンである。

【0013】

特に具体的に例示されるBDV抗原ポリペプチドの配列として、以下のものが挙げられる。各配列の最左部に示す1又は2のグリシンは、スペーサを表す。

p 2 4	P1: 41-55	GG-QPVDQLLKDLRKNPS	(配列番号1)
	P2: 59-77	GG-DPDQRTGREQLSNDLI	(配列番号2)
p 4 0	P3: 3-20	GG-PKRRLVDDADAMEDQDLY	(配列番号3)
	P4:338-358	GG-RYRRREISRGEDGAELSGE	(配列番号4)
p 1 0 (No/98)			
	P5: 18-36	G-GNTTVESGRLSGGRRRSPD	(配列番号5)
	P6: 43-57	G-GLTKTKEDSKECTDP	(配列番号6)
p 1 0 (Control)			
	P7: 18-36	G-GNATIESGRLPGGRRRSPD	(配列番号7)
	P8: 43-57	G-GVTKTTEDPKECTDP	(配列番号8)

【0014】

(抗体測定用試料)

本発明の抗体測定用試料は、生体内の抗体が測定することができれば良く、特に限定されないが、ヒトや動物の全血、血漿、血清、骨髄、バフィーコート、尿、体液、唾液、鼻汁、涙液、糞便由来物等が例示される。

【0015】

(抗体測定方法)

本発明の抗体測定方法は、本発明の抗原ポリペプチドを用いて測定する方法であれば良く、特に限定されない。例えば酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法、凝集法、ウエスタンブロット法、化学発光免疫測定法、など常用されている方法のいずれも適用することができる。特に好ましい測定方法として、免疫凝集法が挙げられる。

例えば、凝集法的一种であるカウンティングインムノアッセイ法(Counting Immunoassay法：以下「CIA法」という。)による測定は、Sysmex Journal Vol.20 No.1, 77-86(1997)に記載の方法により行うことができる。

【0016】

抗原ペプチド感作用担体の例として、有機高分子粉末、無機物質粉末、微生物、血球及び細胞膜片などが挙げられる。有機高分子粉末としては、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストランなどが例示でき、好ましくはラテックス粒子が広く利用される。ラテックスとしては、例えばポリスチレン、ポリスチレンスチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリルニトリルブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニルアクリル酸エステル共重合体、ポリ酢酸ビニルアクリレート等が挙げられる。

【0017】

使用するラテックス粒子の素材及び粒子径は、免疫グロブリンの抗原抗体反応によりラテックス粒子が凝集塊を形成しうるものであれば良く、特に限定されない。ラテックスの平均粒径は、測定対象物の検出濃度あるいは測定機器により $0.05 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 、好ましくは $0.3 \sim 0.85 \mu\text{m}$ のものが適宜選択される。無機物質粉末としては、シリカ、アルミナ、あるいは金、チタン、鉄、ニッケル等の金属片などが例示される。

【0018】

抗原ペプチド感作用担体、具体的に抗原（抗体）結合ラテックス粒子と試料に含まれる抗体（抗原）が反応すると、抗体の量に応じてラテックス粒子が凝集する。カウンティングイムノアッセイでは凝集した粒子ひとつひとつの大きさの違いを弁別してカウントして測定を行う。例えば、凝集していない単独のラテックス粒子のカウント数をM (Monomer)、2個以上のラテックス粒子が凝集したもののカウント数をP (Polymer)、MとPの和をT (Total)としたとき、 P/T を凝集度として算出することができる。

【0019】

担体への抗原感作は、抗原を直接ラテックス粒子に感作させても良く、例えば血清アルブミン等のようなりガンドを目的抗原に結合させて、ラテックス粒子に感作させるなど効率の良い方法を選択することができる。抗原感作量は、担体1mgあたり100 μ gまでの範囲で必要に応じて自由に設定することができる。好ましくは、上記抗原ペプチド及び／又はコンジュゲートBDV抗原ペプチドと非特異反応抑制のためのブロッキング剤として使用する蛋白質とあわせて合計100 μ gまでの範囲で設定することができる。ブロッキング剤は、抗原を感作した後又は抗原と同時に担体に固定することができる。

【0020】

CIA法をはじめとする凝集法によると、ラテックス粒子に固定した抗原に対し、検体試料中の抗体が反応することにより、ラテックス粒子とラテックス粒子が抗体により架橋され、凝集を形成することになる。この場合に、IgMクラスの抗体であっても、IgGクラスの抗体であっても、ラテックスと反応すれば架橋を形成しうるので、IgM及びIgGが混入している検体試料において、IgM及びIgGを同時に測定することが可能となる。さらに、本方法は目的とする抗体が抗原ポリペプチドを感作した不溶性担体と結合することにより検出され、目的抗体をさらに蛍光物質等を感作した抗原や抗体等との反応を必要としない。即ち、本方法によると、ヒト及びヒト以外の哺乳動物の試料についても試薬を変更することなく同様にBDV抗体を検出することができる。BDVは、ウマ等の哺乳動物及びヒトにも感染しうる人畜共通感染症にかかわるものであるため、こ

ここで例示した C I A 法を採用することは有用である。

【0021】

測定方法は公知の方法に従い、用いられる不溶性担体の大きさもしくは濃度、反応時間を設定することにより、散乱光強度、吸光度又は透過光強度の増加もしくは減少を測定することにより行うことができ、これらの方法を2種以上併用してもよい。

【0022】

本発明は、上記抗原ポリペプチドを含む試薬及び試薬キットにも及ぶ。

【0023】

【実施例】

以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0024】

(実施例1) 抗BDV抗体の検出

本実施例は、宮崎県都井岬で管理されているウマ17頭について、BDVの感染の有無を調べた。測定は、1998年に採取した血清について行った。

【0025】

(ウマ血しょうの処理方法)

ヘパリン採血による採血後、氷冷し、当日中に処理し、血しょうサンプルを得た。

【0026】

(抗原ペプチド)

P1, P3, P4, P7及びP8の抗原ペプチドを用いた。

【0027】

(抗原ペプチドの感作)

- 1) 抗原ペプチド p 2 4 (P1) : ペプチド300 μ g をウシ血清アルブミン (B S A) 120 μ g とコンジュゲートさせたもの、
- 2) 抗原ペプチド p 4 0 (P3) : ペプチド300 μ g を B S A 120 μ g とコンジュゲートさせたもの、

3) 抗原ペプチド p 4 0 (P4) : ペプチド $300\mu\text{g}$ を B S A $120\mu\text{g}$ とコンジュゲートさせたもの、

4) 抗原ペプチド p 1 0 (P7) : ペプチド $300\mu\text{g}$ を B S A $120\mu\text{g}$ とコンジュゲートさせたもの、

5) 抗原ペプチド p 1 0 (P8) : ペプチド $300\mu\text{g}$ を B S A $120\mu\text{g}$ とコンジュゲートさせたもの、

上記 1) ~ 5) の B D V 抗原コンジュゲートを、粒径 $0.8\mu\text{m}$ のラテックス粒子懸濁液 (5 mg のラテックス担体を含む) 1 ml に加え、 37°C で 1 時間静置した。その後、ラテックス粒子を洗浄し、各抗原の感作ラテックス液を調製した。また同様にウシ血清アルブミン (B S A) $120\mu\text{g}$ を粒径 $0.8\mu\text{m}$ のラテックス粒子懸濁液 (5 mg のラテックス担体を含む) 1 ml に加え、 37°C で 1 時間静置した。その後、ラテックス粒子を洗浄し、未感作ラテックス液を調製した。

【0028】

(測定)

シスメックス社製測定装置 (P A M I A - 5 0) を用いて抗 B D V 抗体を測定した。

反応プレートのウェルに、ラテックス凝集反応用緩衝液を $80\mu\text{l}$ 、各ウマ血清試料を $10\mu\text{l}$ 及び上記調製したラテックス粒子を含む溶液を $10\mu\text{l}$ を添加し、 45°C で反応させた。

反応を開始して約 15 分後に $19\mu\text{l}$ の反応混合物を装置のチャンバ内の $950\mu\text{l}$ のシース液に加えて 51 倍に希釈した。希釈により、凝集反応を停止させ、その後、凝集度を光学検出部で検出した。

予め測定しておいた検量線 (陰性コントロール P / T % 及びカットオフコントロール P / T %) より式 1 に従い、検体のカットオフインデックス (C O I) 値を求めた。検体の C O I 値により、以下のとおり判定した。

陽性 : C O I \geq 1

陰性 : C O I $<$ 1

【0029】

【式 1】

$$\text{カットオフインデックス (COI)} = \frac{\left(\text{検体測定値 } P/T\% - \text{未感作ラテックス粒子を用いたときの } P/T\% \right)}{\left(\text{カットオフコントロール } P/T\% - \text{陰性コントロール } P/T\% \right)}$$

【0030】

(測定結果)

上記の測定結果を表 1 に示した。その結果、全てのウマ血清について BDV 陽性を示した。

【0031】

(比較例 1)

実施例 1 に記載のウマ 17 頭について、従来法により 1998 年～2001 年にかけて採取した血清について測定を行った。ウマ血清の処理方法は実施例 1 と同様に行った。

【0032】

1. 測定原理:

ECLIA 法は、BDV 抗原を結合したマイクロビーズを固相とし、電気化学変化で発光する Ru 錯体を標識した抗ヒト IgG モノクロナール抗体を用いたサンドイッチ法を原理としている。

各反応について以下に説明する。

・第一反応

抗原結合ビーズと検体を反応させると、検体中の抗体がビーズ上の抗原と結合する。

・第二反応

ビーズに結合した抗体にルチニウム標識抗ヒト IgG モノクロナール抗体を反応させ、サンドイッチ状に結合する。

・第三反応

電極上にビーズを集めて電気エネルギーを加えると、抗体を介してビーズに結合したルチニウム標識抗 IgG モノクロナール抗体量に応じて Ru 錯体が発光す

る。この発光量を計測することにより、検体中の抗体を検出する。

【0033】

2. 測定方法：

以下の手順で測定を実施した。

(1) 反応管に反応液 2 0 0 μ l、被検検体 2 0 μ l、抗原結合ビーズ液を 2 5 μ l 注入し、3 0 $^{\circ}$ C で 9 分間の反応を行った。(第一反応)

(2) 反応管に磁石を接近させ、反応管壁にビーズを集めた後、反応管の液を吸引除去し、さらに洗浄液を注入し、振盪攪拌した。

(3) 反応管に磁石を接近させ、反応管壁にビーズを集めた後、反応管の液を除去した。

(4) 反応管にルチニウム標識抗 I g G モノクロナール抗体液を 2 0 0 μ l 注入し、3 0 $^{\circ}$ C で 9 分間の反応を行った。(第二反応)

(5) 反応管に磁石を接近させ、反応管壁にビーズを集めた後、反応管の液を除去し、さらに洗浄液を注入し、振盪攪拌した。

(6) 反応管に磁石を接近させ、反応管壁にビーズを集めた後、反応管の液を除去し、発光電解液 3 0 0 μ l 注入し、ビーズをフローセル電極に導き、発光量を測定した。(第三反応)

【0034】

3. 使用抗原：

下記 2 種類の抗原を使用

- ・ B D V p 2 4 リコンビナント抗原
- ・ B D V p 4 0 リコンビナント抗原

【0035】

4. 結果

その結果、検体 N o . 1 ~ 9 については、1998 年の結果を比較すると従来法では陰性であったが、本発明の測定方法では陽性であった(表 1)。しかし、従来法で 1998 年の測定結果が陰性と認められたものであっても 1999 ~ 2001 年の測定結果については、陽性が認められた。

一方、検体 N o . 1 0 ~ 1 7 については従来法と本発明の測定結果ともに陽性

であり、一致した（表2）。また、検体No. 18～28については従来法と本発明の測定結果ともに陰性であり、一致した（表3）。

不一致の検体については、従来法で陰性であったにもかかわらず、本発明の抗原ペプチドを用いて測定を行った系では陽性と判断され、感度よくBDV抗体の検出が可能となった。なお、表1～3中の「ND」は、ウマを捕獲することができず、測定できなかったことを示す。

【0036】

【表1】

検体番号	本発明の方法単位:C. O. I.)					従来法 陽性:1000以上			
	1998年					1998年	1999年	2000年	2001年
	p24(A)	p40(C)	p40(D)	p10(G)	p10(H)				
1	2.5 (+)	1.58 (+)	0.00	0.76	4.38 (+)	228	349	1162 (+)	1334 (+)
2	1.3 (+)	1.02 (+)	0.26	1.4 (+)	4.14 (+)	588	763	2098 (+)	ND
3	24.62 (+)	12.66 (+)	1.62 (+)	10.1 (+)	6.78 (+)	634	511	1353 (+)	ND
4	60.44 (+)	29.7 (+)	1.74 (+)	9.81 (+)	4.78 (+)	361	1574 (+)	594	877
5	5.12 (+)	4.7 (+)	2.36 (+)	7.12 (+)	6.18 (+)	397	1115 (+)	1716 (+)	771
6	2.88 (+)	1.14 (+)	0.02	1.140 (+)	0.36	276	938	1580 (+)	1809 (+)
7	1.46 (+)	3.24 (+)	0.64	1.02 (+)	0.60	276	284	4834 (+)	9288 (+)
8	11.56 (+)	6.48 (+)	0.56	5.33 (+)	2.84 (+)	116	979	1630 (+)	791
9	89.46 (+)	54.76 (+)	13.84 (+)	76.42 (+)	54.64 (+)	31	ND	ND	22504 (+)

【0037】

【表2】

検体番号	本発明の方法単位:C. O. I.)					従来法 陽性:1000以上			
	1998年					1998年	1999年	2000年	2001年
	p24(A)	p40(C)	p40(D)	p10(G)	p10(H)				
10	0.64	3.4 (+)	3.44 (+)	9.11 (+)	73.92 (+)	9124 (+)	9169 (+)	19569 (+)	13441 (+)
11	14.66 (+)	14.38 (+)	8.92 (+)	13.30 (+)	12.06 (+)	19648 (+)	10323 (+)	12544 (+)	13351 (+)
12	4.02 (+)	1.64 (+)	2.44 (+)	4.89 (+)	4.08 (+)	14710 (+)	ND	7462 (+)	ND
13	1.46 (+)	2.8 (+)	1.66 (+)	0.46	0.00	9614 (+)	10317 (+)	14289 (+)	12097 (+)
14	12.14 (+)	2.56 (+)	0.28	1.30 (+)	3.64 (+)	5960 (+)	3136 (+)	8933 (+)	ND
15	1.86 (+)	1.62 (+)	0.40	1.64 (+)	7.02 (+)	2689 (+)	ND	3625 (+)	1954 (+)
16	1.1 (+)	1.38 (+)	0.58	1.50 (+)	1.58 (+)	1365 (+)	ND	788	2051
17	9.36 (+)	6.7 (+)	0.00	2.16 (+)	0.10	1935 (+)	1269 (+)	ND	ND

【0038】

【表3】

検体番号	本発明の方法単位:C. O. I.)					従来法 陽性:1000以上			
	1998年					1998年	1999年	2000年	2001年
	p4(A)	p4(C)	p4(D)	p4(G)	p4(H)				
18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	407	851	869	944
19	0.56	0.22	0.16	0.00	0.00	103	308	310	245
20	0.58	0.34	0.20	0.64	0.14	165	820	3646 (+)	3206 (+)
21	0.12	0.24	0.00	0.00	0.00	449	292	644	823
22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	373	876	1398 (+)	2530 (+)
23	0.04	0.06	0.00	0.12	0.00	76	16429 (+)	391	390
24	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	443	566	1606 (+)	982
25	0.02	0.00	0.52	0.00	0.00	138	648	348	305
26	0.00	0.72	0.32	0.00	0.00	276	378	955	1851 (+)
27	0.62	0.80	0.08	0.28	0.00	263	805	751	ND
28	0.54	0.00	0.00	0.12	0.00	352	ND	ND	ND

【0039】

(実施例2)

宮崎県都井岬で管理されている82頭のウマについて、1998年に採取した血清を、本発明の抗原ポリペプチドを用いて実施例1に記載の方法で測定した結果及び従来法である比較例の方法で測定した結果、各測定法によりBDV抗体陽性及び陰性と判断された群について5年間の生存率を調べた。その結果、表4に示すように、本発明の方法で測定した場合には抗体陽性の場合の死亡率が66.7%であり、抗体陰性の場合には死亡率が28.3%であった。一方、従来法による場合には抗体が陽性の場合の死亡率は52.4%であったが、抗体が陰性の場合でも死亡率は42.6%であった。本発明の抗原ポリペプチドを用いて測定した場合は抗体陽性の死亡率が高くあらわれ、測定結果が死亡率に反映し、より正確なBDV感染の検査を行うことが可能となった。

【0040】

【表 4】

BDV抗体陽性ウマの経過観察		1998	1999	2000	2001	2002	
凝集法(本発明方法)	陽性	36				12(33.3%) 7(19.4%) 17(47.2)	生存確認 死亡確認 不明 死亡+不明=24(66.7%)
	陰性	46				33(71.7%) 4(8.7%) 9(19.6%)	生存確認 死亡確認 不明 死亡+不明=13(28.3%)
従来法	陽性	21				10(47.6%) 5(23.8%) 6(28.6%)	生存確認 死亡確認 不明 死亡+不明=11(52.4%)
	陰性	61				35(57.4%) 6(9.8%) 20(32.8%)	生存確認 死亡確認 不明 死亡+不明=26(42.6%)

【0041】

【発明の効果】

以上説明したように本発明の抗原ポリペプチドを用いて測定した結果、BDVに関連する抗原そのものを検出することができないような場合であっても、IgM抗体の出現を見逃すことなく検出することにより、感染の有無を判定することが可能となり有用である。さらに、例示するCIA法は、人畜共通感染症の起因となるBDVを、ウマやヒト等について同一の試薬を用いて検出することができ、極めて有用である。

【 0 0 4 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sysmex Corporation

<120> BDV antigen peptide

<130> NP02-1126

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 1

Gln Pro Val Asp Gln Leu Leu Lys Asp Leu Arg Lys Asn Pro Ser

1

5

10

15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 2

Asp Pro Asp Gln Arg Thr Gly Arg Glu Gln Leu Ser Asn Asp Glu Leu

1 5 10 15

Ile

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 3

Pro Lys Arg Arg Leu Val Asp Asp Ala Asp Ala Met Glu Asp Gln Asp

1 5 10 15

Leu Tyr

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 4

Arg Tyr Arg Arg Arg Glu Ile Ser Arg Gly Glu Asp Gly Ala Glu Leu

1 5 10 15

Ser Gly Glu

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 5

Gly Asn Thr Thr Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Gly Gly Arg Arg Arg

1 5 10 15

Ser Pro Asp

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 6

Gly Leu Thr Lys Thr Lys Glu Asp Ser Lys Glu Cys Thr Asp Pro

1 5 10 15

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 7

Gly Asn Ala Thr Ile Glu Ser Gly Arg Leu Pro Gly Gly Arg Arg Arg

1 5 10 15

Ser Pro Asp

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Borna disease virus

<400> 8

Gly Val Thr Lys Thr Thr Glu Asp Pro Lys Glu Cys Thr Asp Pro

1 5 10 15

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ボルナ病ウイルス(Borna Disease Virus, 以下「BDV」という。)に対する抗体検査をより正確に実施するための抗原ポリペプチド及び該ポリペプチドを用いたBDV測定方法を提供する。

【解決手段】 BDVを構成する蛋白質のうち、p 1 0 領域から選択された抗原を、p 2 4 領域及び／又は p 4 0 領域から選択される抗原ポリペプチドを組み合わせ使用することによる。具体的には、配列番号 7 および 8 に記載の抗原ポリペプチドを p 2 4 領域及び／又は p 4 0 領域から選択される抗原ポリペプチドと組み合わせ使用することによる。



認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-086491
受付番号	50300496579
書類名	特許願
担当官	小松 清 1905
作成日	平成15年 4月 8日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成15年 3月26日
【特許出願人】	
【識別番号】	390014960
【住所又は居所】	神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
【氏名又は名称】	シスメックス株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100088904
【住所又は居所】	東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩 本町ビル6F
【氏名又は名称】	庄司 隆
【選任した代理人】	
【識別番号】	100124453
【住所又は居所】	大阪府大阪市淀川区西中島5-6-13-307 新大阪御幸ビル ユニード国際特許大阪事務所
【氏名又は名称】	資延 由利子

次頁無



特願 2 0 0 3 - 0 8 6 4 9 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 0 0 1 4 9 6 0]

1. 変更年月日 1 9 9 8 年 1 0 月 7 日

[変更理由] 名称変更

住所変更

住 所 神戸市中央区脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号
氏 名 シスメックス株式会社